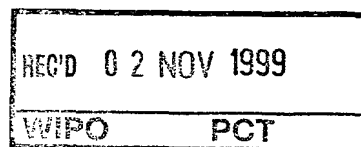


09/763013
13. Okt. 1999

EP 99/6131

4



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

04. 10. 99

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p. o.


R. Mandemaker

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 98/05306

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

M 13 10.99

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation



Anmeldung Nr.: PCT/EP 98/05306
Application no.:
Demande n°:

Anmelder: 1. ORPEGEN Pharma Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Entwicklung
Applicant(s): und Produktion m.b.H. - Heidelberg, Deutschland
Demandeur(s): 2. BRAUM, Günther - Eppelheim, Deutschland
3. LIFFERTH, Axel - Sandhausen, Deutschland

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention: Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT-232 Triacetat) und seine Analoga
Titre de l'invention:

Anmeldetag:
Date of filing: 20. August 1998 (20.08.98)
Date de dépôt:

In Anspruch genommene Priorität(en)
Priority(ies) claimed
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Weiterer Anmelder:

4. BIRR, Christian - Neckargemünd, Deutschland

Feld Nr. V BESTIMMUNGEN VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; ~~wenigstens~~ ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Verfahren zur Herstellung von BIOSTATIN (TT-232 Triacetat) und seine Analoga

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin mittels Festphasensynthese.

10

Zur Synthese von Peptiden sind dem Fachmann verschiedene Verfahren bekannt. Es handelt sich dabei zum einen um Flüssigphasenmethoden, welche auf Shemyakin (Tetrahedron Lett. (1965), 2323 f.) zurückgehen, und zum anderen um Festphasenverfahren, welche erstmals von Merrifield (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2149) beschrieben wurden.

15

Die Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasensynthese sind seither weiterentwickelt und erheblich verbessert worden, es wird hierzu beispielsweise auf "Peptide, Chemie und Biologie", Hans Dieter Jakubke, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, 1996, ISBN 3-8274-0000-7 verwiesen. Dieses Lehrbuch beschreibt Methoden der klassischen als auch der Merrifield-Peptid-Synthese. Derzeit wird zur Peptidsynthese in erster Linie die Peptidsynthese in Lösung angewandt. Insbesondere bei der Synthese von Peptiden, welche mindestens eine Disulfidbrücke ausbilden sollen, besteht im Hinblick auf die Synthese in Lösung allerdings der der Methode inhärente Nachteil, daß diese Disulfidbrücke durch Oxidation in hoher Verdünnung gebildet werden muß. Dies ist im klassischen Verfahren der Peptidsynthese in Lösung nötig, um die erforderliche örtliche Trennung der einzelnen Reaktionszentren zu bewirken und damit eine effektive Cyclisierung zu ermöglichen.

25

30

Das Peptid Biostatin (TT-232) ist ein Analogon des Somatostatins und weist starke in vitro und in vivo Antitumoraktivität auf.

Somatostatin ist ein natürlich vorkommendes Tetradecapeptid, welches die Bildung von Wachstumshormon und die Sekretion weiterer endokriner Moleküle, wie z.B. Glucagon, Insulin und Gastrin, inhibiert. Somatostatin inhibiert oder reguliert einige Zellfunktionen und es wurde darüber hinaus
 5 festgestellt, daß es wichtige endogene antiproliferative Aktivität entfaltet. Es wurde außerdem ein inhibitorischer Effekt von Somatostatin und seinen Analoga auf Tumoren gezeigt. In den letzten Jahren wurden einige Somatostatinanaloga entwickelt, welche längere Wirkungszeiten als das native Hormon und bessere Antitumorwirksamkeit aufweisen. Es wurde
 10 daher viel Mühe aufgewandt, tumorselektive Somatostatinanaloga zu entwickeln, wobei insbesondere auch die leichte Herstellbarkeit eine Rolle spielt.

Eines dieser Analoga ist ein Molekül mit einer 5-Ringstruktur mit der
 15 folgenden Sequenz:

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂.

Das Molekül wurde TT-232 bzw. Biostatin genannt. Dieses Somatostatin-analogon hat praktisch keinen inhibitorischen Effekt auf die Wachstumshor-
 20 monsfreisetzung, zeigt aber starke Antitumorwirksamkeit in vivo und in vitro und induziert die Apoptose. Die Verbindung inhibiert die Tyrosinkinase-Aktivität verschiedener menschlicher Darmtumorzelllinien, wobei diese Inhibition sehr gut mit der beobachteten Inhibition der Zellproliferation übereinstimmte.

25

Die Herstellung von Octa- bzw. Heptapeptid-Derivaten wird beispielsweise in der EP-A-O 505 680 beschrieben. Dort wird aber für eine effektive Cyclisierung über die beiden Cystein-reste das Peptid zuerst von der festen Phase abgetrennt, die Lösung stark verdünnt und dann die Oxidation
 30 bewirkt. Diese Art der Herstellung erfordert aber weitere Aufkonzentrations- und Reinigungsschritte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, durch welches Biostatin besonders leicht und mit besonders hoher Ausbeute an freigesetztem Peptidamid nach der Disulfidoxidation erhalten werden kann.

5

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.

15

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens angewandte Festphasensynthese kann in dem Fachmann an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Die hierfür geeigneten Festphasenmaterialien, die benötigten Reagenzien, Puffer, Reaktionsbedingungen und einzusetzenden Schutzgruppen für die Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Feststellung, daß die örtliche Trennung der Reaktionszentren bei der Bildung der Disulfidbrücken in Biostatin in ausreichender Weise gewährleistet ist, wenn die Oxidation erfolgt, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden ist.

25

Im Rahmen der Erfindung ist es sowohl möglich, direkt nach Synthese desjenigen Teils von Biostatin, welcher die zu verbrückenden Sulfhydrylgruppen enthält, eine Oxidation und damit Ausbildung der Disulfidbrücke zu bewirken, und dann das Peptid fertig zu synthetisieren, als auch zuerst das vollständige Peptid zu synthetisieren und danach die Oxidation durchzufüh-

30

ren. Maßgeblich ist jedoch, daß die Oxidation erfolgen muß, solange das Peptid festphasen-gebunden vorliegt.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, die Oxidation vor
Abspaltung der Schutzgruppen des Peptids durchzuführen.

Zur Oxidation können alle auch bisher bereits für in Lösung durchgeführte
Verfahren bekannte Oxidationsmittel eingesetzt werden. Geeignete
Oxidationsmittel sind dem Fachmann daher bekannt. Beispiele für derartige
10 Oxidationsmittel sind Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalze, Jod, Peroxide
oder Sauerstoff. Diese Oxidationsmittel werden in Gegenwart eines
geeigneten Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches angewandt.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird besonders bevorzugt als
Oxidationsmittel Jod, beispielsweise in essigsaurer Lösung oder in einem
Lösungsmittel auf Basis von N,N-Dimethylformamid eingesetzt.

Nach abgeschlossener Oxidation erfolgen Waschungen des polymergebun-
denen Peptids mit verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemi-
20 schen. Hierzu können z.B. N,N-Dimethylformamid, Methanol, Essigsäure und
Wasser oder aber auch Lösungen von komplexierenden Reagenzien oder
Reduktionsmitteln, wie insbesondere Thiosulfat oder Ascorbinsäure
eingesetzt werden.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft an einer festen Phase
durchgeführt, welche eine säurelabile Ankergruppe (acid labile anchoring
bond, ALAB) aufweist. Besonders bevorzugt wird als feste Phase ein
Polymer, insbesondere Polystyrol, eingesetzt. Vorteilhaft können auch
modifizierte Harze verwendet werden, wie Aminomethylpolystyrol (AMPS),
30 Benzhydrylamin-(BHA-PS) und Methylbenzhydrolamino-polystyrol (MBHA-
PS). Die feste Phase kann dabei in für die Festphasensynthese üblicher Form

eingesetzt werden. Bevorzugt wird die Festphase in Form von Kügelchen, sogenannter "Beads", eingesetzt.

5 Geeignete Ankergruppen sind in der Festphasenchemie übliche Anker, welche die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger in einfacher Weise erlauben. Besonders bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung Ankergruppen, welche die Abspaltung des Peptids als Amid ermöglichen. Beispielhafte mit einer säurelabilen Ankergruppe derivatisierte Polymere (ALAB-P) sind 5-(9-amino)xanthen-2-yl-oxyveryl-4'-methyl-benzhydrylamino-
10 polystyrol und 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-aminomethyl-phenoxyacetyl-4''-methyl benzhydrylamino-polystyrol.

Besonders bevorzugte Ankergruppierungen sind desweiteren 4-Hydroxymethyl-benzoesäure (HBMA), 9-Amino-xanthenyl-3-hydrol (Xant) oder p[(R,5)-
15 α -(1-(9H-Fluoren-9-yl)methoxyformamido)-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure [MEOBP]. Am meisten bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung die Xant- und die MEOBP-Gruppierung.

Die Synthese wird im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt mit der
20 Fmoc-/tert. Butyl-Strategie durchgeführt. Dies bedeutet, daß die zum Aufbau des Peptids benötigten Aminosäuren an der Aminogruppe mit einer Fmoc-Schutzgruppe und an den Seitenkettengruppierungen mit tert. Butylgruppen derivatisiert sind. Die Fmoc-Schutzgruppe ist dabei eine temporäre Schutzgruppe, da sie bei der Ausbildung des Peptids abgespalten
25 wird, und lediglich eine Fmoc-Gruppe am N-Terminus des synthetisierten, festphasengebundenen Peptids verbleibt.

Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine werden vorteilhaft mit Trityl- oder Acmschutzgruppen derivatisiert. Es ist außerdem besonders bevorzugt, die N-
30 terminal letzte Aminosäure im Sequenzaufbau als N-alpha Boc-geschütztes Aminosäurederivat einzusetzen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Syntheseverfahrens werden die folgenden Schritte durchlaufen:

1. Beladung des polymeren Trägers mit dem Anker und/oder dem ersten Aminosäurederivat
2. Aufbau der Peptidsequenz
3. Knüpfung der Disulfidbrücke
4. Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger und/oder der Schutzgruppenabspaltung
5. Schutzgruppenabspaltung (sofern nicht bereits unter 4. erfolgt).

Zur Abspaltung der im synthetisierten Peptid enthaltenen Schutzgruppen können literaturbekannte Methoden, z.B. Zugabe von verdünnter Piperidinlösung, angewandt werden.

Die Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach an sich bekannten Methoden. Im Fall der säurelabilen Ankergruppen erfolgt die Abspaltung sauer, besonders bevorzugt mit konzentrierter oder verdünnter Trifluoressigsäure.

Die Abspaltung der Schutzgruppen der von der Festphase gelösten Peptide erfolgt in der Regel ebenfalls durch Säurezugabe, bevorzugt wiederum mittels Trifluoressigsäure. Nach der Abspaltung der Peptide können gewünschtenfalls weitere Reinigungs- oder/und Konzentrationsschritte durchgeführt werden. Eine Reinigung kann hierbei vorteilhaft mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die Synthese gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geht in einer besonders bevorzugten Ausführungsform von Fmoc-Threonin(tert.butyl-ether)amid aus, welches kovalent an eine Polystyrol-Festphase über eine säurelabile Xanthenyl-Ankergruppierung gebunden ist.

In der Folge werden die einzelnen geschützten Aminosäuren zugegeben unter Bildung eines Festphasen-gebundenen geschützten Peptids. Zur Ausbildung der Disulfidbrücke wird das Heptapeptid sodann an der Festphase durch Zugabe von Jod/N,N-Dimethylformamid oder Essigsäure oxidiert und das cyclisierte Heptapeptid durch Säurebehandlung vom Träger abgelöst. Gleichzeitig werden alle Schutzgruppen an Seitenketten des Peptids abgespalten.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern.

Beispiel 1:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

395g Fmoc-MEOBP-MBHA-Harz (Beladung 0,84 mmol/g) werden unter Verwendung von 1,5 l N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt und durch Taumeln gemischt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Die Taumelbewegung wird während aller Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 1,5 l N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 30 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 267,1 g (672 mmol) Fmoc-Thr(tBu)

in 375 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von
 5 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

10 Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

15

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt)
 20 in 375 N.N-Dimethylformamid, 104,4g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von
 25 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol) Fmoc-Cys(Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml
 30 N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie

Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

5

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

- 10 Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden folgende Lösungen vorbereitet: 314,9 g (672 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem
- 15 deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 157,4 g (336 mmol)
- 20 Fmoc-Lys(Boc) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie
- 25 Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

- 30 Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden folgende Lösungen vorbereitet: 286,8 g (672 mmol) Fmoc-D-Trp in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 143,3 g (336 mmol) Fmoc-D-Trp in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

20

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

25 Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden folgende Lösungen vorbereitet: 308,8 g (672 mmol) Fmoc-Tyr(tBu) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von

30

228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 154,4 g (336 mmol) Fmoc-Tyr(tBu) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden

Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

5 Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten

Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

10

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 178,3 g (672 mmol) Boc-D-Phe in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid.

15 Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 89,1 g (336 mmol) Boc-D-Phe in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 400 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird
20
25 eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 15, Umsetzung mit Boc₂O

30

Das aus Stufe 14 resultierende Produkt wird mit 4 l N.N-Dimethylformamid versetzt und 20 Minuten agitiert. Dann werden 400 g Boc₂O zugegeben,

nach 5 Minuten werden in 5 Minuten Abstand 3 Portionen DIEA a 200 ml zugegeben. Nach 1000 Minuten wird abgesaugt, es folgen 5 DMF-Waschschritte (s.o.) a 3 l und 3 analoge MeOH-Waschschritte wobei jeweils 2,5 l MeOH eingesetzt werden. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 833 g polymergebundenes Peptid erhalten.

Stufe 16, Knüpfung der Disulfidbrücke

Zu 833 g polymergebundenem Peptid (0,37 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 15 wird eine Lösung von 416,5 g Jod in 6 l N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 8 l N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 8 l. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 Waschschritte mit einer Mischung aus 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l Wasser sowie 2 DMF-Waschschritte a 8 l. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 672,4 g (0,45 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) .

Stufe 17, Abspaltung vom Polymer

Zu 672,4 g polymergebundenem Peptid aus Stufe 16 wird eine Lösung von je 120 ml m-Cresol und Wasser in 6 l Trifluoressigsäure (Abspaltreagenz) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach saugt man ab und versetzt das Harz erneut mit Abspaltreagenz. Die erste Nachspaltung wird nach 30 Minuten abgesaugt, es folgen Nachspaltungen von einer bzw. zwei Stunden Dauer. Die jeweiligen Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei 30°C Wasserbadtemperatur im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit 3 l Ether verrührt, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 1,5 l Ether gewaschen. Nach 16

stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 231,85 g Peptid erhalten.

Ausbeute: 13,4% d.Th. über alle Stufen, 14,8% bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 2:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

3,64 g Fmoc-XANT-Harz (Beladung 0,55 mmol/g) werden unter Verwendung von 25 ml N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt, geschüttelt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Das Schütteln wird während allen Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 25 ml N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 25 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden 2,39 g (6 mmol) Fmoc-Thr(tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen

und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

5

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

10 Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys (Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

20

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

25 Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden 2,81 g (6 mmol) Fmoc-Lys(Boc), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04mL (12mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen

30

und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

5

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

- 10 Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden 2,56 g (6 mmol) Fmoc-D-Trp, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA.
- 15 Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

20

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

- 25 Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden 2,76 g (6 mmol) Fmoc-Tyr (tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA.
- 30 Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

5 Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 11) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys(Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese
10 Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

15

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

20 Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 13) werden 1,59 g (6 mmol) Boc-D-Phe, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese
25 Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 13) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

30

Stufe 15, Knüpfung der Disulfidbrücke

Zu 5 g polymergebundenem Peptid (0,30 mMol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 14 wird eine Lösung von 2,5 g Jod in 50 ml N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 50 ml N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 50 ml. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 16 ml N.N-Dimethylformamid und 4 ml 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 DMF-Waschschritte. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 4,1 g (0,34 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

Stufe 16, Abspaltung vom Polymer und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen

1 g polymergebundenen Peptid werden 10 mal für je 10 Minuten mit jeweils 5 ml 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt. Anschließend wird 3 mal mit 5 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Die Abspaltlösungen werden gepoolt, eingedampft und 30 Minuten in 2,5 ml Trifluoressigsäure gerührt. Dann wird in 20 ml Ether präzipitiert, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 10 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 332 mg Peptid erhalten.

Ausbeute: 23,9 % d.Th. über alle Stufen,
33,0 % bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 3: Disulfid-Oxidation mit Thallium-trifluoracetat

Zunächst wird eine Festphasensynthese wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, jedoch an einem BHA-PS (Beladung 1 mmol/g) das mit

MEOBP-Linker beladen wird. Es wird FmocCys(Acm) statt Fmoc-Cys(Trt) verwendet.

136 mg $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ werden in 1 ml N.N-Dimethylformamid gelöst (Oxidations-
 5 lösung), 0,5 g polymergebundenes Peptid (0,38 mmol Peptid/g Peptid-Trä-
 gerkonjugat) werden 5 Minuten mit 3 ml N.N-Dimethylformamid geschüttelt,
 dann werden 0,725 ml Oxidationslösung zugegeben. Nach 30 minütigem
 Schütteln bei 25°C wird abgesaugt, und mit je 5 ml der folgenden
 Lösungsmittel gewaschen: 3x N.N-Dimethylformamid, 3x MeOH, 1 x 10 %
 10 HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in
 N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Di-
 methylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x H_2O , 3 x 10 % HAc in MeOH,
 3 x 10 % HAc in H_2O , 3 x N.N-Dimethylformamid, 3 x MeOH, 3 x H_2O , 3
 x MeOH. Es wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 420
 15 mg (0,40 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

Es werden 0,25 ml Triethylsilan mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt
 (Abspaltreagenz). 0,4 g polymergebundenes Peptid werden 30 Minuten mit
 3 ml Abspaltreagenz geschüttelt, dann wird abgesaugt und 2,5 ml
 20 Abspaltreagenz zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln wird abgesaugt,
 und das Harz noch 1 und 2 Stunden mit je 2,5 ml Abspaltreagenz behan-
 delt. Die Filtrate werden eingedampft, mit je 3 ml Ether verrieben, die dabei
 anfallenden Niederschläge werden über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal
 mit je 2 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum
 25 werden insgesamt 119 mg Peptid erhalten.

Ausbeute: 8,6 % d.Th. über alle Stufen,
 8,6 % bezogen auf die Abspaltung

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase
- 10 abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oxidation nach Aufbau des vollständigen Peptids bewirkt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Oxidation ein Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalz, Jod, ein Peroxid oder Sauerstoff, und insbesondere Jod in essig-saurer Lösung oder N,N-Dimethylformamid verwendet.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

daß man als Festphase ein eine säurelabile Ankergruppierung aufweisendes Polystyrol verwendet.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die säurelabile Ankergruppierung eine Xanthyl- oder eine MEOBP-Gruppe umfaßt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Synthese Aminosäuren verwendet, die durch eine Fmoc-Gruppierung an der Aminogruppe und durch tertiäre Butylgruppen an den Seitenketten geschützt sind.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Sulfhydryl-Gruppen enthaltende Aminosäuren ebenfalls mit Schutzgruppen versehen verwendet.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Abspaltung des Peptids vom Polymer und die Abspaltung der Schutzgruppen gleichzeitig bewirkt.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Aufreinigung des hergestellten Peptids nach Abtrennung von der Festphase durchgeführt wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232)
5 mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises
Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisier-
ten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid
von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation
des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines
10 geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die
feste Phase gebunden vorliegt.

1
2
3
4

5
6
7
8